Code No. 212-006

環境試料 DNA 抽出キット

Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2

取扱説明書

日鉄住金環境株式会社

【特徴】

Extrap Soil DNA Kit Plus は、土壌、活性汚泥などの環境試料から微生物 DNA を抽出・精製するためのキットです。本製品は、広範な環境試料から高純度な DNA を高収率で回収できるため、環境試料に存在する微生物の群集構造解析やリアルタイム定量 PCR などのアプリケーションに適しています。

- ・菌体の破砕法としてビーズビーティングを採用しており、広範な微生物種の細胞を破砕して DNA を得ることができます。
- ・土壌粒子への DNA の吸着を抑制する独自の添加剤が含まれており、高い収率で DNA を回収することができます。
- ・DNA の精製に磁性ビーズを採用することにより、簡単な操作での DNA 精製を可能としました。
- ・フェノールやクロロホルム等の有機溶媒を使用しないため、安全にご使用いただけます。

【キットの内容】

開封されましたら梱包内容、外観、数量、溶液等に異常がないかご確認ください。

	50 回分
・Bead Tubes	50 本
・Extraction Buffer	71 ml
・Lysis Solution	4 ml
・PP Solution	18 ml
・MBs Solution	3 ml
・Binding Solution	54 ml
・Washing Solution	48 ml

※Lysis solution、Binding solution、Washing Solution は結晶が析出する場合がありますが、品質に問題はありません。結晶が析出した場合は、容器ごと 45 ～60 ^{o}C 程度で加温し、結晶を完全に溶解してください。

【保存】

・室温・暗所で保存してください。（15 ~ 30 ^{o}C）
・多湿な場所は避けてください。

【本製品以外に必要な主な試薬、器具、機器】

1. **試薬**

・70%エタノール
・溶出液 (TE バッファー、滅菌水等)

2. **器具**

・マイクロピペット
・マイクロピペット用チップ
・1.5 mL チューブ
・2 mL チューブ
・マグネティックスタンド 1.5mL 用
　推奨製品: MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stands
　（Promega 社製, Cat No. Z5332 または Z5342）

3. **機器**

・細胞破砕装置（2 mL チューブ対応）
　推奨製品: FastPrep シリーズ（MP Biomedicals 社製）、ビーズクラッシャーμT-01（タイテック社製）
・ボルテックスミキサー
・遠心機（最大遠心力 14,000×g 以上）
・ヒートブロックまたはウォーターバス

【ご留意事項】

・本製品の使用にあたっては、実験室での一般的な注意事項を厳守し、安全に留意してください。
・本製品は研究用試薬です。臨床検査、その他の目的に使用しないようご注意ください。
・取扱説明書の記載と異なるお取り扱いによるトラブルについては責任を負いかねます。
・試薬には皮膚を刺激する物質が含まれていますので、人によっては皮膚が荒れるなどの症状が出ることがあります。作業を行う際にはグローブを装着してください。
・容器の破損や異物が認められたものは使用しないでください。
・本品には、土壌への DNA の吸着を抑制する独自の添加剤が既に含まれています。
吸着防止剤として一般的に使用されるスキムミルク等を、さらに添加しないようにしてください。
・本キットには、真正細菌由来の DNA が微量ながら含まれております。具体的には、本キットの DNA 抽出液:1μℓあたり、本キット由来 16S rRNA 遺伝子が 50 コピー程度含まれております。細菌含有量が少ない試料を対象に DNA 抽出される場合など、キット由来の DNA が、正常な解析を妨害すると考えられる場合には、本キットのご使用は困難となりますので、その点を十分にご考慮いただいた上でご使用下さい。
・磁性ビーズの DNA 吸着容量は、10 ～ 20 μg です。試料中に含まれる DNA 量がこれを超える場合は、DNA 回収効率が低下しますので、試料の使用量を少なめにしてください。

【プロトコル】

1. Bead Tubes に、環境試料 0.5 g（液体試料の場合は 500 μL）、Extraction Buffer 950 μL、Lysis Solution 50 μL を添加する。
2. ボルテックスミキサーで 5 秒間撹拌する。
3. ビーズビーティング(4～6 m/秒 または 4,200 rpm～6,800 rpm で、30～45 秒間)
4. 遠心 (14,000×g, 5 分, 4 ^{o}C)
5. 上清 600 μL を 1.5 mL チューブに移し、PP Solution 300 μL を添加する。
6. 5.のチューブを 10 回程度転倒混和し、撹拌。
7. 遠心(14,000×g, 5 分, 4 ^{o}C)
8. 上清 800 μL を 2 mL チューブに移す。

9. 8 のチューブに MBs Solution 50 µL、 Binding Solution 890 µL を添加する。
10. 9.のチューブを 2 分間程度転倒混和し、よく撹拌する。
11. 10 のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットする。
12. 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
13. 12 のチューブに Washing Solution 800µL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。
14. 13 のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドにセットして 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用して上清を除去する。
15. 70%エタノール溶液 1 mL を添加し、ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。
16. 15 のチューブをスピンダウンし、マグネティックスタンドで 1 分以上集磁したのち、マイクロピペットを使用してエタノールを除去する。
17. 15～16 の工程を再度繰り返す。
18. チューブの蓋をあけたまま、室温で磁性粒子を 10 分間程度風乾する。
19. 溶出液 (TE バッファー、滅菌水等) 100 µL を添加後、ボルテックスミキサー（低速）で十分に撹拌する。
20. 途中で数回撹拌しながら、65 ^{o}C のヒートブロック(またはウォーターバス)で 5~10 分間加温する。
21. マグネティックスタンドにチューブをセットして集磁したのち、溶出液を新しいチューブに移す。

※ 操作上の留意点

（操作 1）

コンポスト等の比重の軽い試料の場合、試料をプロトコルに記載の重量分（0.5g）、Bead Tubes に添加しますと、Bead Tubes 内において試料が占める割合が高まり、その結果、破砕ビーズの動きが制限され、細胞破砕が充分に行われず、DNA 回収効率が低下する場合があります。上記の状況が想定された場合には、試料の添加量を、破砕ビーズの動きが制限されない程度に減らしていただいた上で、破砕を行って下さい。

（操作 1）

菌体濃度が低いと予想される液体試料の場合、メンブレンフィルターを用いて試料中の微生物をろ過・捕捉し、このフィルターから DNA を抽出することをお奨めします。具体的な工程は、まず液体試料を市販のメンブレンフィルターにてろ過します。次に、ピンセット等を用いて、ろ過済のメンブレンフィルターを Bead Tubes に挿入します。その後は通常のプロトコルに従い抽出作業を行います。

（操作 12）

上清には PCR 阻害物質が含まれていますので、上清をできる限り取り除いてください。ただし、黒い磁性粒子には DNA が吸着されていますので、磁性粒子を除去しないようご注意ください。

（操作 16）

エタノールは、1000 µL のピペットチップを使用して大部分を除去した後に、100 µL 以下の容量のピペットチップを使用してできる限りしっかりと取り除いてください。エタノールが残っていると、以降の工程で DNA が溶出しにくくなり、DNA の回収量が低下する恐れがあります。

(操作 18)

エタノールが残らないよう、できる限り取り除いてから風乾してください。磁性粒子は風乾してもサラサラになりませんが、そのまま溶出液を添加してください。

（操作 19～21）

溶出液を添加すると、DNA が溶出液中に溶出します。

お問い合わせ先
日鉄住金環境株式会社　J-Bio21 センター
〒305-0045 茨城県つくば市梅園 2-1-13　筑波コウケンビル
TEL:　029-856-7527　　FAX:　029-856-7526
E-mail:　jb-order@eco-tech.nssmc.com